HIV BLOT 2.2

TESTE WESTERN BLOT

CE
0123

DATA DE REVISÃO: 05/05
MAE 0011-BRA-0

Observação: alterações realçadas.

REF (kit de 18 testes) : 11030-018
(kit de 36 testes) : 11030-036

NOME E APLICAÇÃO

O **MP Diagnostics (MPD) HIV BLOT 2.2** é um imunoensaio qualitativo para a detecção *in vitro* de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2) no soro e plasma humanos. Destina-se a ser usado como um teste complementar mais específico para amostras de soro ou plasma humanos que apresentaram resultados repetidamente reativos por procedimentos de triagem ou rastreamento, como os testes imunoenzimáticos ELISA.

INTRODUÇÃO

Existem vários testes de triagem ou rastreamento para a detecção de anticorpos tanto contra o HIV-1 como contra o HIV-2, os agentes etiológicos da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Esses testes podem ser extremamente sensíveis porém menos específicos, levando a interpretações falso positivas. Por isso, são necessários testes independentes complementares de especificidade elevada para confirmar a presença de anticorpos contra o HIV-1 e/ou HIV-2.

O kit **HIV BLOT 2.2 da MP Diagnostics** foi concebido para ser usado como teste complementar mais específico para amostras de soro ou plasma humanos que apresentaram resultados repetidamente reativos pelo teste de ELISA. Antígenos virais específicos do HIV-1 separados e incorporados em fitas por procedimentos eletroforéticos seguidos de eletrotransferência, combinados na mesma fita com um peptídeo sintético específico do HIV-2, permitem observar melhor as respostas mediadas por anticorpos para proteínas virais específicas. Cada fita inclui também um controle interno de adição de amostra para minimizar o risco de falso-negativos provocados por erros operacionais e para assegurar a adição de amostras.

DESCRIÇÃO DE SÍMBOLOS USADOS

Os símbolos gráficos usados ou encontrados nos produtos e embalagens **MP Diagnostics** estão indicados a seguir. Estes são os símbolos mais comuns em dispositivos médicos e respectivas embalagens. Estes símbolos são explicados com mais detalhes no British and European Standard BS EN 980: 2003.

Usar até
Sinônimos:
Data de Validade

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Código do lote
Sinônimos:
Número do lote
Código da remessa

Número de catálogo

Limites de temperatura

Atenção. Ver Instruções de Uso

Fabricante

Representante Autorizado na Comunidade Européia

Contém o suficiente para <n> testes

Consulte as instruções de uso

Não reutilize

PRINCÍPIOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DO PROCEDIMENTO

As fitas de nitrocelulose são incorporadas com proteínas antigênicas separadas e fixadas do HIV-1, parcialmente purificado e inativado, por procedimentos de transferência (blotting) eletroforética e nas mesmas fitas incorpora-se um peptídeo sintético específico do HIV-2. Cada fita de nitrocelulose é incubada com soro ou plasma diluídos e controles. Os anticorpos específicos contra o HIV-1 e HIV-2, caso estejam presentes nas amostras, vão fixar-se às proteínas do HIV-1 e ao peptídeo do HIV-2 nas fitas. As fitas são lavadas para remover o material não fixados. Os anticorpos que se fixam, especificamente às proteínas do HIV, podem ser visualizados por uma série de reações que envolvem o uso de anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina e do substrato BCIP/NBT. Este método é suficientemente sensível para detectar quantidades mínimas de anticorpos específicos contra o HIV no soro ou plasma.

COMPONENTES DO KIT

	Descrição do Componente	Quantidade Fornecida
ANTIGEN STRIPS	**FITAS DE NITROCELULOSE** Incorporadas com lisado de HIV-1, com peptídeo específico do envoltório do HIV-2 e com uma banda de controle de adição de soro. Mantenha seco e ao abrigo da luz.	Disponível em 18 ou 36 fitas

CONTROLE NÃO-REATIVO — 1 frasco (80 µl)
Soro humano normal inativado, não reativo para antígenos superficiais de hepatite B (HBsAg), nem para anticorpos contra HIV-1/2 e HCV. Contém azida sódica e tiomersal como conservantes.

CONTROLE REATIVO FORTE — 1 frasco (80 µl)
Soro humano inativado contendo título elevado de anticorpos contra HIV-1 e HIV-2, e não reativo para HBsAg nem para anticorpos contra HCV. Contém azida sódica e tiomersal como conservantes.

CONTROLE REATIVO FRACO — 1 frasco (80 µl)
Soro humano inativado que contém título baixo de anticorpos APENAS contra HIV-1 e não reativo para HBsAg e anticorpos contra HIV-2 e HCV. Contém azida sódica e timerosal como conservantes.

BUF | STOCK | 10x

SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE CONCENTRADA (10x) — 1 frasco (20 ml)
Solução-tampão Tris com soro caprino normal inativado pelo calor. Contém timerosal como conservante.

BUF | WASH | 20x

SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA (20x) — 1 frasco (70 ml)
Tris com Tween-20. Contém timerosal como conservante.

CONJUGATE

CONJUGADO — 1 frasco (120 µl)
Anticorpo caprino anti-IgG humana conjugado à fosfatase alcalina. Contém azida sódica como conservante.

SUBS | BCIP / NBT

SUBSTRATO — 1 frasco (100 ml)
Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) e azul de nitrotetrazólio (NBT).

POWDER | BLOTTING

PÓ PARA BLOTTING — 10 embalagens (1 g cada)
Leite desnatado em pó

Bandejas de incubação, 9 poços cada — 2 ou 4 bandejas

Manual de Instruçõesl — 1 exemplar

Pinça — 1 par

Nota: O volume de reagentes fornecido é suficiente para 4 processamentos.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Para uso exclusivo em diagnóstico *in vitro.*
2. Exclusivamente para uso profissional.
3. Solicitamos consultar a documentação dos produtos para informações sobre componentes potencialmente perigosos.

INFORMAÇÕES DE SAÚDE E SEGURANÇA

CUIDADO: Este kit contém material de origem humana. Nenhum método de teste pode oferecer garantia total que os produtos de sangue humano não transmitam infecções.

MANUSEIE AS AMOSTRAS ASSIM COMO OS CONTROLES REATIVOS FORTES, REATIVOS FRACOS E OS CONTROLES NÃO REATIVOS COMO AGENTES POTENCIALMENTE INFECCIOSOS. Recomenda-se que os componentes e as amostras do teste sejam manuseados de acordo com as boas práticas de laboratório. O descarte deverá ser realizado de acordo com procedimentos de segurança vigentes.

O ***Controle Reativo Forte, o Controle Reativo Fraco*** e ***o Controle Não Reativo*** contêm timerosal e azida sódica, enquanto a Solução-Tampão Estoque Concentrada e a Solução-Tampão de Lavagem Concentrada contêm timerosal e o Conjugado contém azida sódica. A azida sódica pode reagir com o cobre e o chumbo usados em alguns sistemas de canalização formando sais explosivos. Embora as quantidades usadas neste kit sejam pequenas, o descarte de materiais contendo azida deve ser feito por lavagem com volumes relativamente altos de água de forma a evitar a formação de azida metálica no sistema de canalização. As frases de risco (R) pertinentes são:

R22 Nocivo se ingerido.

O ***Substrato*** contém 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato e azul de nitrotetrazólio, classificado pelas Diretivas da Comunidade Econômica Européia (CEE) aplicáveis como nocivo (Xn). As frases de risco (R) pertinentes são:

R20/21/22 Nocivo por inalação, em contato com a pele e em caso de ingestão.

1. Evite a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar alíquotas dos frascos originais.
2. Não pipete com a boca.
3. Manuseie as amostras de testes, as fitas de nitrocelulose e os Controles Reativos, Fracos e Não Reativos como agentes potencialmente infecciosos.
4. Use vestuário de laboratório e luvas descartáveis durante a realização do teste. Descarte as luvas em sacos plásticos para lixo biológico perigoso. A seguir, lave bem as mãos.
5. É altamente recomendável que este teste seja realizado numa câmara adequada para material biológico perigoso.
6. Mantenha todo o material longe de alimentos e bebidas.
7. Em caso de acidente ou contato com os olhos, lave imediatamente com água em abundância e procure ajuda médica.
8. Consulte imediatamente um médico caso ocorra ingestão de materiais contaminados ou contato destes com feridas abertas, ou outras soluções de continuidade da pele.

9. Enxugue imediatamente derramamentos de materiais infecciosos com papel absorvente e limpe imediatamente a área contaminada com solução de hipoclorito de sódio a 1 % antes de continuar o trabalho. O hipoclorito de sódio não deve ser usado em derramamentos contendo ácidos, a não ser que a área seja primeiro enxugada com papel absorvente. O material usado (inclusive as luvas descartáveis) deve ser descartado como material biológico potencialmente perigoso. Não esterilize em autoclave material que contenha hipoclorito de sódio.
10. Antes do descarte, esterilize em autoclave a 121°C e 15 p.s.i, durante 30 minutos, todo o material contaminado utilizado. Alternativamente, descontamine o material em solução de hipoclorito de sódio a 5 % durante 30-60 minutos antes de descartar em sacos para lixo biológico perigoso.
11. Descontamine todos os produtos químicos e reagentes usados adicionando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1 %. Deixe agir durante 30 minutos para garantir uma descontaminação eficiente.
12. Não é recomendável reutilizar as bandejas de incubação.

PRECAUÇÕES ANALÍTICAS

1. Para garantir um desempenho perfeito do teste é necessário **SEGUIR À RISCA** os procedimentos descritos neste Manual de Instruções. A inobservância destes procedimentos podem acarretar resultados anômalos.
2. **NÃO MODIFIQUE OU SUBSTITUA REAGENTES DE UM LOTE DE KIT PARA OUTRO.** Os controles, o conjugado e as fitas de Western Blot são combinadas entre si para oferecer um desempenho perfeito. Use somente reagentes fornecidos com o kit.
3. Não use componentes do kit após a data de validade impressa na caixa do kit.
4. Evite a contaminação microbiana dos reagentes ao abrir e retirar alíquotas dos frascos originais. A contaminação reduz prematuramente a vida útil dos kits e fornece resultados errôneos. Use técnicas asssépticas como por exemplo pipetas ou ponteiras de pipetas descartáveis para retirar alíquotas dos frascos.
5. Em cada processamento de amostras de pacientes, deve-se testar os controles do kit em paralelo.
6. Use uma ponteira de pipeta nova para cada alíquota de amostra, para evitar contaminação cruzada,
7. Para melhores resultados, aplique todos os reagentes enquanto ainda estiverem frios e retorne-os ao armazenamento entre 2°C e 8°C, o mais depressa possível.
8. Recomenda-se que a vidraria a ser usada com os reagentes seja lavada com ácido clorídrico 2M e enxaguada abundantemente com água destilada ou deionizada antes do uso.
9. Use somente água de qualidade grau reagente, deionizada ou destilada, para diluir os reagentes.
10. Todos os reagentes devem ser bem misturados antes do uso.
11. A solução de Conjugado de Trabalho, a Solução-Tampão de Lavagem Diluída e a Solução-Tampão para Blotting devem ser **preparadas logo antes do uso.**
12. A solução de Conjugado de Trabalho deve ser preparada usando um recipiente ou bécher de polipropileno.
13. Não exponha os reagentes nem realize testes em áreas que apresentem altos níveis de vapores de desinfetantes químicos (e.g., vapores de hipoclorito) durante as etapas de armazenamento ou de incubação. O contato inibe a reação colorida. Da mesma forma, não exponha os reagentes à luz intensa.
14. O teste deverá preferencialmente ser realizado à temperatura ambiente (25°C ± 3°C).
15. Certifique-se que as fitas de teste estão dispostas com os números nas fitas voltados para cima.
16. Para a prova de Western Blot, é importante usar um agitador de plataforma oscilante e não um agitador rotativo. Caso contrário, o desempenho do kit ficará comprometido. A velocidade e o ângulo de inclinação recomendados para o agitador são de 12 a 16 ciclos por minuto, e 5 a 10 graus, respectivamente.
17. Se usar equipamento automático, confira se está aferido antes do uso.
18. Certifique-se que as amostras são adicionadas longe da fita. A bandeja pode ser agitada e a amostra adicionada no local onde a solução-tampão for coletada na extremidade inferior. Isto evitará a formação de manchas escuras devido à adição de amostra na fita.
19. Evite o uso de congeladores do tipo *frost free* para armazenar reagentes e amostras.
20. Não recomendamos o uso de amostras diluídas ou liofilizadas, pois podem fornecer resultados falsos. Se formarem parte ou a totalidade do painel QC, deverá ser efetuada a validação.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

1. Conserve o kit HIV BLOT 2.2 MPD e seus componentes entre 2°C e 8°C quando não estiverem em uso.
2. Todos os reagentes e fitas do teste permanecem estáveis até a data de validade fornecida no kit, se conservados entre 2°C a 8°C. Não congele os reagentes.

A. **Fitas com antígeno**
- Evite a exposição desnecessária das fitas de antígenos à luz.

B. **Reagentes**
- Conserve os reagentes em seus recipientes originais e mantenha-os tampados ao armazená-los.
- Aplique todos os reagentes ainda frios e volte a armazená-los entre 2°C e 8°C o mais rápido possível.
- Quando o substrato for conservado entre 2°C e 8°C poderão se formar precipitados. Isto não afetará o desempenho do kit.

Cuidado: Evite a exposição desnecessária do substrato à luz.

COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Podem ser usadas amostras de soro ou plasma coletadas em EDTA, heparina ou citrato de sódio. Antes do armazenamento, certifique-se que os coágulos e/ou as células sangüíneas foram separadas por centrifugação.

As amostras devem ser conservadas entre 2°C e 8°C se o teste for realizado dentro de 7 dias após a coleta, ou congeladas a -20°C se for previsto que o teste será realizado em mais de 7 dias após coleta. É preferível usar amostras límpidas e não hemolisadas. Amostras lipêmicas, ictéricas ou contaminadas (partículas) devem ser filtradas (0,45µm) ou centrifugadas antes do teste.

As amostras dos pacientes podem ser inativadas, mas esta não é uma exigência para um desempenho ótimo do teste.

Inative da seguinte forma:
1. Afrouxe as tampas dos recipientes de amostra.
2. Aqueça a amostra a 56 °C durante 30 minutos em banho-maria.
3. Deixe a amostra esfriar antes de reapertar as tampas.
4. A amostra pode ser mantida congelada até o momento da análise.

Recomendamos que as amostras dos pacientes não sejam submetidas a múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento antes das análises.

MATERIAIS ADICIONAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Água deionizada ou destilada
- Luvas descartáveis
- Plataforma oscilante (com velocidade de agitação na faixa de 12 a 16 oscilações por minuto e com capacidade de inclinação entre 5° e 10°, para lavagem uniforme das membranas)
- Pipetadores e ponteiras de volumes adequados
- Sistema de aspiração e contenção em hipoclorito de sódio
- Banho-maria a 56°C (opcional)
- Hipoclorito de sódio para descontaminação

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

1. SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA

(a) A SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA deve ser **preparada logo antes do uso.**

(b) Dilua 1 volume de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA (20X) com 19 volumes de água grau reagente. Misture bem.

2. SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING

(a) A SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING deve ser **preparada logo antes do uso.**

(b) Dilua 1 volume de SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE CONCENTRADA (10X) com 9 volumes de água grau reagente. Misture bem.

(c) Adicione 1 g de PÓ PARA BLOTTING a cada 20 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO ESTOQUE diluída, preparada na etapa 2(b) acima. Agite para dissolver completamente o pó.

(d) Agite novamente antes de aplicar.

3. SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO

Nota : Prepare a solução num recipiente ou bécher de polipropileno.

(a) A SOLUÇÃO DE CONJUGADO TRABALHO deverá ser **preparada logo antes do uso.**

(b) Prepare a SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO diluindo o CONJUGADO a 1:1000 em SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING, por exemplo, 5 µl de CONJUGADO para 5 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING.

4. SOLUÇÃO DE SUBSTRATO (pronta para uso)

(a) Distribua diretamente o volume necessário a partir do frasco. Use uma pipeta limpa. Feche bem após o uso.

PROCEDIMENTO DO TESTE - PROVA RÁPIDA

Nota: a) Os usuários podem usar o assay rápido ou de noite funcionar os testes. As faixas do HIV são mais tornadas e mais faixas podem aparecer com o assay de noite, mas o desempenho total dos dois assays é o mesmo.

b) Aspire todos os reagentes e produtos químicos usados para um recipiente de contenção com hipoclorito de sódio.

c) Todas as incubações devem ser realizadas em plataforma de agitação por oscilação.

Cuidado:
Algumas amostras provocam manchas escuras no ponto da fita em que são aplicadas. Para evitar este problema, deve-se:

i. Aplicar a amostra somente após a adição da SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING.
ii. Inclinar a bandeja ligeiramente, elevando a extremidade superior ou inferior da bandeja. A Solução-Tampão para Blotting fluirá para a extremidade mais baixa da bandeja. Adicione a amostra onde a Solução-Tampão para Blotting é coletada. Quando todas as amostras tiverem sido adicionadas, retorne a bandeja à posição horizontal original. Certifique-se que as fitas mantêm-se sempre úmidas durante o procedimento.
iii. Alternativamente, caso não deseje inclinar a bandeja, as amostras podem ser adicionadas na extremidade superior ou inferior do poço. Desta forma, a leitura da fita não será afetada caso tenham se desenvolvido manchas escuras.

Procedimento:

1. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA a cada poço. — **2 ml**
2. Usando pinça, retire cuidadosamente o número necessário de FITAS do tubo e coloque-as em cada poço com a face numerada voltada para cima. Inclua fitas para controles Reativo Forte, Reativo Fraco e Não Reativo.
3. Incube as fitas durante 1 e 2 minutos à temperatura ambiente (25±3°C) sobre uma plataforma oscilante (velocidade de 12 a 16 ciclos por minuto). Remova a solução-tampão por aspiração. — **2 minutos**
   (Nota: Não permita que as tiras sequem a falha pode resultar em marcas aquosas em tiras desenvolvidas para alguns espécimes.)
4. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING a cada poço. — **2 ml**
5. Adicione 20 µl de cada soro de paciente ou de controle nos poços apropriados. Deve-se ter cuidado para ter a certeza que as amostras não são adicionadas diretamente sobre as fitas. — **20 µl**
6. Cubra a bandeja com a tampa fornecida e incube durante 1 hora à temperatura ambiente (25±3°C) na plataforma oscilante. — **60 minutos**
7. Retire cuidadosamente a tampa, evitando respingos ou misturar as amostras. Incline a bandeja para aspirar a mistura dos poços. Troque as ponteiras de aspiração entre as aplicações de amostras para evitar contaminação cruzada.

8. Lave cada fita 3 vezes com 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA e deixe-as imersas durante 5 minutos sobre a plataforma oscilante entre cada lavagem. **3 x 2 ml**
9. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO a cada poço. **2 ml**
10. Cubra a bandeja e incube durante 1 hora à temperatura ambiente (25±3°C) na plataforma oscilante. **60 minutos**
11. Aspire o CONJUGADO dos poços. Lave como na etapa 8. **3 x 2 ml**
12. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE SUBSTRATO em cada poço. **2 ml**
13. Cubra a bandeja e incube-a durante 15 minutos na plataforma oscilante. **15 minutos**
    (Nota: A reação pode ser parada antes de 15 minutos se todas as faixas forem visíveis.)
14. Aspire o SUBSTRATO e enxágüe as fitas pelo menos três vezes com água de grau reagente para interromper a reação (a lavagem insuficiente nesta etapa poderá provocar o desenvolvimento de um fundo escuro). **3 x 2 ml**
15. Usando pinça, retire cuidadosamente as fitas e coloque-as sobre toalhas de papel. Cubra com toalhas de papel e seque. Alternativamente, deixe as fitas secarem nos poços da bandeja.
16. Monte as fitas sobre folha de papel branco não absorvente. Não aplique fita adesiva sobre as bandas reveladas. Observe as bandas (ver Interpretação de Resultados) e interprete os resultados. Para armazenamento, conserve as fitas em local escuro.

PROCEDIMENTO ALTERNATIVO - TESTE OVERNIGHT

Procedimento:

1. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA a cada poço. **2 ml**
2. Usando pinça, retire cuidadosamente o número necessário de FITAS do tubo e coloque-as em cada poço com a face numerada voltada para cima. Inclua fitas para controles Reativo Forte, Reativo Fraco e Não Reativo.
3. Incube as fitas durante 1 e 2 minutos à temperatura ambiente (25±3°C) sobre uma plataforma oscilante (velocidade de 12 a 16 ciclos por minuto). Remova a solução-tampão por aspiração. **2 minutos**
   (Nota: Não permita que as tiras sequem a falha pode resultar em marcas aquosas em tiras desenvolvidas para alguns espécimes.)
4. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING a cada poço. **2 ml**
5. Adicione 20 µl de cada soro de paciente ou de controle nos poços apropriados. **20 µl**
6. Cubra a bandeja com a tampa fornecida e incube *overnight* (16 - 20 horas) à temperatura ambiente (25±3°C) na plataforma oscilante. **overnight**
7. Retire cuidadosamente a tampa, evitando respingos ou misturar as amostras. Incline a bandeja para aspirar a mistura dos poços. Troque as ponteiras de aspiração entre as aplicações de amostras para evitar contaminação cruzada
8. Lave cada fita 3 vezes com 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA e deixe-as imersas durante 5 minutos sobre a plataforma oscilante entre cada lavagem. **3 x 2 ml**
9. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO a cada poço. **2 ml**
10. Cubra a bandeja e incube durante 30 minutos à temperatura ambiente (25 ±3°C) na plataforma oscilante. **30 minutos**
11. Aspire o CONJUGADO dos poços. Lave como na etapa 8. **3 x 2 ml**
12. Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE SUBSTRATO em cada poço. **2 ml**
13. Cubra a bandeja e incube-a durante 15 minutos na plataforma oscilante. **15 minutos**
    (Nota: A reação pode ser parada antes de 15 minutos se todas as faixas forem visíveis.)
14. Aspire o SUBSTRATO e enxágüe as fitas pelo menos três vezes com água de grau reagente para interromper a reação (a lavagem insuficiente nesta etapa poderá provocar o desenvolvimento de um fundo escuro). **3 x 2 ml**
15. Usando pinça, retire cuidadosamente as fitas e coloque-as sobre toalhas de papel. Cubra com toalhas de papel e seque. Alternativamente, deixe as fitas secarem nos poços da bandeja.
16. Monte as fitas sobre folha de papel branco não absorvente. Não aplique fita adesiva sobre as bandas reveladas. Observe as bandas (Ver Interpretação de Resultados) e interprete os resultados. Para armazenamento, conserve as fitas em local escuro.

RESUMO DOS PROTOCOLOS DO TESTE

Reagentes	Qtde	Temp Amb Prova Rápida	Temp Amb Prova Overnight
Fita de nitrocelulose	1	-	-
Solução-Tampão de Lavagem	2 ml	1-2 min	1-2 min
Solução-Tampão para Blotting	2 ml	-	-
Amostra	20 µl	60 min	Overnight (16 - 20 horas)
Solução-Tampão de Lavagem	3 x 2 ml	3 x 5 min	3 x 5 min
Conjugado	2 ml	60 min	30 min
Solução-Tampão de Lavagem	3 x 2 ml	3 x 5 min	3 x 5 min
Substrato (pronto para uso)	2 ml	15 min (ou menos)	15 min (ou menos)
Água destilada	3 x 2 ml	-	-

QUANTIDADE NECESSÁRIA DE REAGENTES PARA QUANwTIDADES DIFERENTES DE FITAS							
Reagentes	NÚMERO DE FITAS A USAR						
	3	6	9	15	20	27	36
Solução-Tampão de Lavagem 1X (ml)	60	100	140	240	300	400	520
Solução-Tampão para Blotting 1X (ml)	20	40	60	80	100	120	160
Conjugado (µl)	11	17	23	35	45	59	77
Substrato (ml)	11	17	23	35	45	59	77
Pó para Blotting (g)	1	2	3	4	5	6	8

CONTROLE DE QUALIDADE

Recomenda-se processar os controles Não Reativo, Reativo Forte e Reativo Fraco junto a cada teste, independentemente do número de amostras sob análise. Para que todos os resultados obtidos nos testes sejam considerados válidos, as seguintes condições deverão ser preenchidas:

1. **CONTROLE NÃO REATIVO**
   Não se devem observar bandas específicas para HIV-1 e HIV-2 nas fitas de controle Não Reativo. A banda para o controle de soro deve ser visível (Fig 1c).

2. **CONTROLE REATIVO FORTE**
   Todas as bandas de peso molecular relevantes devem estar evidentes. A Figura 1a fornece um guia das posições relativas de bandas visualizadas com o HIV BLOT 2.2 MPD e permite a identificação das bandas observadas com o CONTROLE REATIVO FORTE. As bandas observadas são p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120/gp160, Outras bandas associadas a antígenos do centro (core) viral (p39, p42) também podem estar visíveis. Cuidado para não interpretar estas bandas erroneamente como gp41. Os antígenos de envoltório, gp41, gp120/gp160, sendo típicas de glicoproteínas, aparecem como bandas difusas. A banda de soro controle estará visível. A banda específica de HIV-2 também deverá estar visível como mostrado na Figura 1a.

3. **CONTROLE REATIVO FRACO**
   O controle Reativo Fraco fornece uma medida da sensibilidade do kit. Devem aparecer bandas fracas em p24 e/ou gp41 e em gp120/gp160. Bandas fracas adicionais podem ou não estar presentes. A banda de soro controle estará visível (Fig 1b).

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

NOTA : As fitas reveladas devem estar completamente secas para evitar erros de interpretação.

A presença ou ausência de anticorpos contra o HIV-1 na amostra é determinada pela comparação de cada fita de nitrocelulose sob teste com as fitas de controle analisadas com os controles NÃO REATIVO, REATIVO FORTE e REATIVO FRACO.

A Figura 1a é apresentada como uma ajuda para a identificação das várias bandas reveladas na fita que reagiu com o Controle REATIVO FORTE.

POR FAVOR, NOTE: A extremidade numerada das fitas deve ser colocada na parte inferior como mostrado na Figura, i.e. as bandas gp120/gp160 são as mais afastadas da extremidade numerada.

PESO MOLECULAR	GENE	ANTÍGENO	DESCRIÇÃO
gp 160	ENV	Forma polimérica da gp41	Glicoproteína difusa e larga
gp 120	ENV	Membrana externa	Glicoproteína difusa
p66	POL	Transcriptase Reversa	Banda discreta
p55	GAG	Proteína precursora	Banda discreta
p51	POL	Transcriptase reversa	Banda discreta logo abaixo de p55
p39	GAG	Fragmento de p55	Banda discreta
gp41	ENV	Transmembrana	Glicoproteína difusa
p31	POL	Endonuclease	Dupla
p24	GAG	Proteína central	Banda larga
p17	GAG	Proteína central	Banda larga

Alguns dos antígenos mencionados na tabela acima derivam de uma mesma proteína precursora e podem ter epítopos sobrepostos. Isto deve ser considerado quando se interpreta o padrão, por exemplo:

1. É pouco provável detectar gp41 na ausência de gp160 porque a gp160 é a forma polimérica da gp41 e a concentração de gp160 é mais elevada do que a de gp41 no HIV BLOT 2.2 MPD. A gp41 aparece como uma banda difusa. Qualquer banda nítida e discreta na região da gp41 não deve ser interpretada como uma banda gp41. Muitas amostras normais e não infectadas pelo HIV apresentam-se reativas a este antígeno que não pertence ao HIV, mas que parece ter origem na linhagem de células humanas utilizadas para cultivar o HIV.

2. A banda p55 é geralmente detectada quando existe reatividade forte para p24 e/ou p17. As bandas visualizadas como p42 e p39 são ambas fragmentos de GAG e não devem ser interpretadas como gp41 (ENV).

3. As bandas POL p66, p51 e p31 são geralmente detectadas simultaneamente. Contudo, as sensibilidades de p66 e p31 são maiores que a de p51.

4. A reatividade cruzada do HIV-2 é variável mas tipicamente exibe reatividade com antígenos GAG e/ou POL. No entanto, em alguns casos pode ocorrer reatividade cruzada com a banda gp160, mas raramente, com a gp41.

5. Existe também uma banda de alto peso molecular com aproximadamente 160 kDa que se presume ser uma proteína precursora de GAG-POL. Isto é observado em alguns soros com títulos elevados para HIV-2 ou indeterminados (reativos somente para GAG) mas o padrão da banda é uma banda discreta, diferente da banda difusa da gp160 do ENV.

O procedimento de interpretação envolve as seguintes etapas:

1. Confirmar se a banda de soro controle está visível. Se o controle estiver negativo, os resultados deverão ser considerados inválidos, visto que isto indica um erro técnico tal como não adição de amostra, conjugado ou substrato.

2. Identificação dos pesos moleculares de todas as bandas da fita de teste usando as fitas de Controle REATIVO FORTE e/ou FRACO como guia.

3. A interpretação da fita do teste baseia-se, pois, na detecção de padrões de bandeamento específicos conforme as recomendações das autoridades competentes (i.e., Ministério da Saúde, Organização Mundial da Saúde, etc.)

As diretrizes específicas para a interpretação podem divergir dependendo de normas locais. A MPD recomenda seguir as normas aceitas em conformidade com os regulamentos locais. A seguir, indicam-se os critérios de orientação recomendados por diversos organismos internacionais de regulamentação.

ORGÃO REGULAMENTADOR	CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO
Centers for Disease Control (CDC) e ASTPHLD	Pelo menos uma ENV (gp41 e gp120/160) e p24
American Food and Drug Administration (FDA)	p24 e p31 e gp41 ou gp120/gp160
Centre National Transfusion Sanguine	Duas bandas ENV com GAG ou POL
Organização Mundial da Saúde (WHO)	Duas bandas ENV com ou sem GAG ou POL
Consortium for Retrovirus Serology Standardization	Uma banda de p24 ou p31 e banda ENV
Cruz Vermelha Americana	Uma banda cada de GAG, POL e ENV
German Association for Control of Viral Diseases (DVV)	Uma banda ENV e pelo menos uma banda GAG ou POL, ver também DIN 58 969, parte 41

Para interpretar o HIV BLOT 2.2 MPD recomendamos aplicar as orientações. Os resultados devem ser registrados para cada banda detectada e interpretados como NEGATIVO, POSITIVO ou INDETERMINADO.

PADRÃO	INTERPRETAÇÃO
Nenhuma banda viral específica presente	NEGATIVO
Detecção de anticorpos contra p17 **UNICAMENTE** e ausência total de outras bandas.	NEGATIVO
Detecção de 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17, p24, p55) **ou** POL (p31, p51, p66)	HIV-1 POSITIVO
Detecção de 2 ENV (gp160/gp41 e gp120) e GAG (p17, p24, p55) **ou** POL (p31, p51, p66) e a banda específica de HIV-2 é visível.	HIV-1 POSITIVO com INDÍCIOS DE HIV-2
Quaisquer bandas virais específicas presentes mas o padrão **não** satisfaz os critérios para POSITIVO	INDETERMINADO
Quaisquer bandas virais específicas presentes mas o **padrão não satisfaz** os critérios para POSITIVO e a banda específica de HIV-2 é visível.	INDETERMINADO com INDÍCIOS DE HIV-2

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

A detecção de anticorpos contra HIV-1 não constitui um diagnóstico da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). Um BLOT NEGATIVO não garante ausência do agente causador da AIDS. Embora um blot POSITIVO para anticorpos contra o HIV-1 indique infecção pelo vírus, o diagnóstico de AIDS só pode ser feito clinicamente se a pessoa reunir as características que definem a AIDS, estabelecida pelo Center for Disease Control (EUA), pela Organização Mundial da Saúde ou por outras autoridades competentes.

Sabe-se que pessoas que se tornaram soropositivas há pouco tempo podem apresentar padrões incompletos mas desenvolverão crescente reatividade (tanto no número quanto na intensidade das bandas) quando são acompanhadas por períodos de dois a seis meses. A maioria dos blots com resultados POSITIVOS apresentarão outras bandas virais específicas.

Os blots INDETERMINADOS não deverão ser usados como base para o diagnóstico de infecção por HIV. Recomenda-se que todos os BLOTS INDETERMINADOS sejam reanalisados usando-se a amostra original e amostras subseqüentes. Os doadores de sangue com blots INDETERMINADOS devem ser novamente testados usando-se uma amostra nova, após dois a seis meses. Sabe-se também que anticorpos específicos para p24 e p31 diminuem no decurso da AIDS, ocasionando uma mudança na interpretação do blot de POSITIVO para INDETERMINADO. Em tais situações, a interpretação dos resultados deve portanto ser baseada em testes de blot e avaliações clínicas subseqüentes.

Devido à sua natureza altamente específica, a NÃO REATIVIDADE de amostras com o peptídeo específico do envoltório do HIV-2 num blot viral classificado como Indeterminado, não exclui a possibilidade de infecção por outras cepas de HIV-2.

As amostras que indicam infecções por HIV-2 devem ser posteriormente analisadas com o Kit de Western Blot para HIV-2.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

O desempenho do HIV BLOT 2.2 MPD para a detecção de anticorpos contra HIV-1 ou HIV-2 foi avaliado em estudos clínicos.

Tabela 1 : Estudo da sensibilidade da reatividade do antígeno viral de HIV-1 com amostras soropositivas para HIV-1 (Número de amostras = 197)

PERFIL SOROLÓGICO	HIV BLOT 2.2 NÚMERO (%)	HIV-1 WB DUPONT/ORTHO NÚMERO (%)
GAG, POL e ENV	192 (97,5 %)	188 (95,4 %)
p24, p31, gp41 e/ou gp120/gp160	187 (94,9 %)	179 (90,9 %)
ENV e GAG ou POL	197 (100,0 %)	197 (100,0 %)

Tabela 2: Estudo da especificidade da reatividade de antígeno viral de HIV-1 com amostras de doadores normais e soros com outras infecções virais.

TIPO DE AMOSTRA	NÚMERO	POSITIVOS	REATIVIDADE PARA HIV-1	
			INDETERMINADA*	NEGATIVA
Doadores Normais	208	0	11	197
HTLV-1	5	0	0	5
CMV	5	0	1	4
EBV (IgM)	5	0	1	4
V.zoster (IgG)	5	0	1	4
Sarampo	6	0	2	4
Rubéola	5	0	1	4
Caxumba	4	0	1	3
Adenovírus	5	0	2	3
HSV	5	0	0	5
Dengue	5	0	1	4
Total	**258**	**0**	**21**	**237**

*Todas exibiam apenas as bandas p24 ou p17.

Tabela 3 : Estudo da sensibilidade da banda do peptídeo do HIV-2 com amostras soropositivas para HIV-2. (Número de amostras = 178)

Western Blot HIV-2 Perfil sorológico@	Reatividade para o peptídeo do HIV-2	
	Positiva	Negativa
GAG, POL e 2 ENV	160	0
GAG, POL e 1 ENV	18	0

@Soros definidos como positivos pelo NEW LAV Blot 2 da Diagnostics Pasteur.Dados fornecidos pelos Drs. Oliviero E. Varnier e Flavia Lillo. Laboratório de Retrovírus Humanos, Universidade de Gênova.

Tabela 4 : Estudo da especificidade da banda do peptídeo do HIV-2 com soros positivos para HIV-1, amostras de soros de doadores normais e soros com outras infecções virais.

TIPO DE AMOSTRA	NÚMERO	REATIVIDADE PARA O PEPTÍDEO DO HIV-2	
		POSITIVA	NEGATIVA
Soropositivo para HIV-1	197	16[a]	181
Doadores Normais	208	0	208
Soropositivo para HTLV-1	5	0	5
CMV	5	0	5
EBV (IgM)	5	0	5
V.zoster (IgG)	5	0	5
Sarampo	6	0	6
Rubéola	5	0	5
Caxumba	4	0	4
Adenovírus	5	0	5
HSV	5	0	5
Dengue	5	0	5
Total	**455**	**16**	**439**

[a]Quando analisadas pelo Western Blot para HIV-2 da MPD, 6 destas amostras apresentaram reatividade com ENV e GAG ou POL, 9 reagiram apenas com GAG e/ou POL
e 1 amostra era negativa.

Um total de 15 painéis comerciais de soroconversão de HIV-1 foram testados com HIV Blot 2.2 MPD e os resultados mostraram que o HIV Blot 2.2 MPD foi capaz de detectar anticorpos contra HIV antecipadamente ou na mesma amostra em todos os painéis.

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE EXPLÍCITA LIMITADA

O fabricante não oferece nenhuma outra garantia expressa senão a de que o kit de teste funcionará como um ensaio de diagnóstico *in vitro* dentro das especificações e limitações descritas neste Manual de Instruções do Produto quando usado em conformidade com as instruções nele contidas. O fabricante isenta-se de qualquer garantia, expressa ou implícita, incluindo as garantias expressas ou implícitas em relação à capacidade de comercialização, de utilização ou utilidade implícita para quaisquer outros fins. A responsabilidade do fabricante limita-se à substituição do produto ou ao reembolso do preço de compra do produto. O fabricante não será considerado responsável pelo comprador nem por terceiros por quaisquer danos, prejuízos ou perdas de caráter econômico causados pelo uso ou aplicação do produto.

PROBLEMAS TÉCNICOS/ QUEIXASPROBLEMAS TÉCNICOS / QUEIXAS

Caso haja algum problema técnico ou queixa, solicitamos proceder da seguinte forma:
1. Anote o número de lote do kit e a data de validade.
2. Conserve o kit e os resultados obtidos.
3. Contate o escritório MP Biomedicals mais próximo ou o seu distribuidor local.

REFERÊNCIAS

1. V.C.W.Tsang, K. Hancock, M. Wilson. D.F. Palmer, S. Whaley, J.S. Mc Dougal, and S. Kennedy. March 1985. Developmental Procedure : Enzyme-linked Immunoelectro-transfer Blot technique for HTLV-III/LAV antibodies; CDC, Altanta.

2. H. Towbin, T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci.. USA 76: 4350-4354.

3. J. Schupbach, M. Popovic, R. V. Gilden. M.A. Gonda, M. G. Sarngadharan and R. C. Gallo. 1984. Serological Analysis of subgroup of Human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. Science 224, 503-505.

4. M. G. Sarngadharan, M. Popovic, L. Bruch, J. Schupbach and R. C. Gallo. 1984. Antibodies reactive with human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. Science 224, 506-608.

5. CDC. 1985. “ Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing Acquired Immune Deficiency Syndrome” - United States Morbidity and Mortality Weekly Report 34 (1) :1-5.

6. WHO Collaborating Group on HIV-2 1990, WHO Weekly Epidem. Rec. 10, p74-75.Sarngadharan and R. C. Gallo. 1984. Serological Analysis of subgroup of Human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. Science 224, 503-505.

7. F. Clavel, D. Guetard., F. Brun-Vezinet, et al. 1986 Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science; 233:343-346,

8. F. Clavel., 1987. HIV-2, the West African AIDS virus. AIDS 1:135-140,

9. R.S. Tedder, A. Hughes, T. Corrah et al 1988. Envelope cross-reactivity in Western Blot for HIV-1 and HIV-2 may not indicate dual infection. Lancet 11:927-930,

10. Bottiger B., A. Karlsson, F. Andreasson et al. 1990. Envelope cross-reactivity between Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 detected by different serological methods: Correlation between cross-neutralization and reactivity against the main neutralizing site. J. Virol. 64(7):3492-3499.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Singapore 118259
Tel N°. : + 65 6775 0008
Fax N°. : + 65 6775 4536
E-mail : enquiry_ap@mpbio.com

Medical Technology Promedt
Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert
Alemanha
Tel N°. : + 49 68 94 58 1020
Fax N°. : + 49 68 94 58 1021
E-mail : info@mt-procons.com

Escritórios Regionais:

MP Biomedicals Suisse S.A.
Halle de Fret/Aeroport
P.O. Box 1015
1211 Genebra 5
Suíça
Tel N°. : (4122) 788-1908
Fax N°. : (4122) 788-1986
E-mail: mpbiosuisse@mpbio.com

* E.U.A. Patente 5.721.095

* O nome e o logotipo Genelabs são licenciados da Genelabs Technologies, Inc.

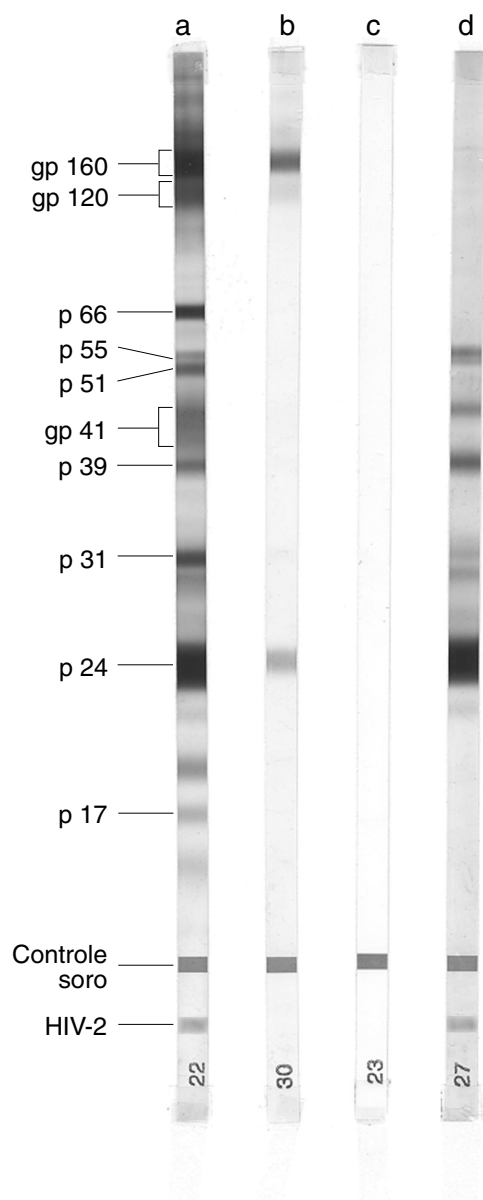
FIGURA 1

a. Controle Reativo Forte (Reativo para HIV-1 e HIV-2)
b. Controle Reativo Fraco (Reativo somente para HIV-1).
c. Controle Não Reativo.
d. Um soro soropositivo para HIV-2 característico.

TABELA PARA SOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Desenvolvimento de manchas escuras nas fitas

1. Contaminação por bactérias ou fungos da amostra de teste.
2. Precipitação de complexos imunes em amostras de teste envelhecidas.
3. Contaminação da fita por bactérias ou fungos devido a armazenamento inadequado.
4. Fitas danificadas, trincadas ou arranhadas fisicamente.
5. Fitas lavadas inadequadamente entre as etapas do teste.

Desenvolvimento de manchas brancas nas fitas

1. As fitas foram viradas durante o teste.
2. Bandejas lavadas inadequadamente antes do uso.
3. Má diluição do pó para Blotting.
4. Interferência eletrotransblot durante a fabricação.

Bandas esperadas não se desenvolvem ou apresentam baixa intensidade

Verifique o controle positivo

Controle positivo baixo

É provável que o problema seja causado pelos reagentes.

1. Os reagentes não foram preparados devidamente.
2. Erro na diluição do conjugado.
3. Reagentes instáveis devido a exposição a temperatura inadequada.
4. Conjugado contaminado com IgG humana.
5. pH incorreto do substrato devido a exposição a luz UV intensa ou agente redutor.
6. Bandejas, reagentes ou água com alta concentração de fosfato.
7. Plataforma rotativa usada em lugar de plataforma oscilante.

Controle positivo bom

É provável que o problema seja causado pela amostra de teste.

1. Erro na diluição da amostra de teste.
2. Amostra de teste contaminada pelo conjugado.
3. As amostras de teste formam complexos imunes severos.
4. A amostra de teste IgG deteriorou-se ou desnaturalizou-se devido a múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento ou armazenamento inadequado.
5. Plataforma rotativa usada em lugar de plataforma oscilante.
6. A amostra de teste pode ser um “falso”-positivo ELISA.

Bandas não específicas desenvolvem-se sem indicação de HIV-2

1. A amostra está muito forte e reage a rastros de quantidades intermediárias.
2. Amostra cruzada reage com proteínas H-9 presentes em preparados virais (por exemplo, HLA, ABC, DR)
3. Bandas legitimadas (antígenos de-glicosados do envelope) foram identificadas a cerca de 80 a 90 kD em algumas amostras de teste.

Uma forte ação desenvolve-se no fundo da fita quando da ausência ou presença de bandas positivas.

1. Fitas superdesenvolvidas (a reação é interrompida antes).
2. Lavagem incompleta.

Ausência de banda de controle de soro

1. Soro não adicionado.
2. As fitas foram viradas durante o teste.
3. Conjugado não adicionado.
4. Substrato não adicionado.

Outras bandas, diferentes das bandas de controle de soro, desenvolvem-se no controle negativo

Poços da bandeja ou controle podem ter passado por contaminação cruzada.

Bandas não específicas e/ou fundo escuro desenvolvem-se nas fitas

1. Erro na diluição da amostra de teste ou do conjugado.
2. Amostra de teste/ incubação do reagente muito longa.
3. Lavagem incompleta durante o teste.
4. Temperatura de incubação maior que 30 °C.
5. Amostra de teste reativa a proteínas não virais.

Fitas defeituosas

1. Apresentam trincas.
2. Contêm bolhas que causam o surgimento de manchas brancas em zonas reativas, grandes o suficiente para evitar a detecção.
3. Apresentam manchas escuras devido ao crescimento de fungos quando os tubos de fitas foram inicialmente abertos. Contudo, se manchas escuras se desenvolverem depois de um certo tempo após a abertura inicial do tudo, é provável que o problema deva-se a condições inadequadas de armazenamento das fitas no local.

Banda nítida e discreta na região de gp41

1. Não é gp41, pois gp41 é uma banda difusa.
2. Não interprete como gp41.
3. Existe a possibilidade de ser uma linha celular de proteína, p42.

Manchas de água nas fitas desenvolvidas

1. As fitas secaram após a pré-imersão e antes da adição da solução-tampão para blotting.